

### Procédé d'amélioration des plantes

La présente invention concerne un procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon produits dans les plantes et/ou pour augmenter la teneur des  
5 plantes en amidon.

L'amidon est le polysaccharide de stockage énergétique chez les végétaux. Il constitue le principal apport calorique de l'alimentation animale et humaine et est également une source majeure de matière première végétale pour des  
10 utilisations non alimentaires. L'amidon est composé de deux fractions polysaccharidiques distinctes : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose, qui représente la fraction minoritaire de l'amidon, est constitué de résidus glucose unis par des liaisons  $\alpha$ -1,4, et présente moins de 1% de ramifications. L'amylopectine, qui représente la fraction majoritaire de l'amidon, est  
15 constituée de résidus glucose unis par des liaisons  $\alpha$ -1,4, et présente environ 5% de ramifications, constituées par des résidus de glucose liés au polymère principal par une liaison  $\alpha$ -1,6. La distribution asymétrique de la ramification de l'amylopectine est responsable de la croissance illimitée des molécules d'amidon et par conséquent des grains d'amidon, et rend également compte de  
20 la plupart des propriétés physico-chimiques de l'amidon.

La biosynthèse de l'amidon dépend d'une voie métabolique dont les étapes biochimiques principales sont la synthèse d'ADP-glucose suivie par le transfert de ce précurseur en position  $\alpha$ -1,4 sur un glucane par des (ADP-glucose :1,4- $\alpha$ -D-glucane 4- $\alpha$ -D-glucosyl)transférases, le polymère formé étant  
25 ramifié par l'action des enzymes dites de ramification ou de « branchement » : les 1,4- $\alpha$ -D-glucane 6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glucano)-transférases.

La dégradation de l'amidon implique plusieurs enzymes, dont l' $\alpha$ -amylase (endoamylase), la  $\beta$ -amylase (exoamylase), l'amyloglucosidase, et l' $\alpha$ -glucane phosphorylase (amidon phosphorylase).

30 Le rôle de ces diverses enzymes de dégradation de l'amidon n'est pas clairement établi. Par exemple, il a été rapporté qu'une expression réduite d'une phosphorylase dans les feuilles, par répression par antisens, n'avait pas

d'influence significative sur l'accumulation d'amidon, chez la pomme de terre (Sonnewald et al., 1995).

Puisque la répression par antisens de l'activité  $\alpha$ -glucane phosphorylase n'avait pas d'influence significative sur l'accumulation d'amidon dans les  
5 feuilles de pommes de terre transgéniques, les auteurs en ont conclu que la rupture de l'amidon n'était pas catalysée par les phosphorylases.

Le brevet US 5,998,701 divulgue que la réduction de la teneur en phosphorylase dans les tubercules de pomme de terre a pour conséquence une diminution substantielle de l'accumulation des sucres, ce qui peut être mis  
10 à profit pour allonger les durées de stockage des tubercules.

Le brevet US 6,353,154 propose, quant à lui, de modifier les activités de l'amidon phosphorylase chez les plantes, en particulier le maïs, dans le but d'obtenir une synthèse d'amidon qui serait modifiée dans sa structure.

15 Les inventeurs ont maintenant mis en évidence que l'inactivation du gène codant pour une amidon phosphorylase induit une augmentation significative de la taille des grains d'amidon produits dans les plantes, ainsi que de la quantité d'amidon accumulé.

Sur cette base, la présente invention fournit un procédé pour augmenter  
20 la taille des grains d'amidon d'une plante ou d'une partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

Ce procédé est particulièrement avantageux pour augmenter les rendements lors de l'extraction et de la purification de l'amidon à l'échelle industrielle. En effet, les grains d'amidon les plus petits sont généralement  
25 perdus au cours des lavages lors des processus d'extraction et de purification. Une augmentation de la taille des grains permet d'éviter la perte d'une partie des grains d'amidon.

La présente invention fournit également un procédé pour augmenter la teneur en amidon d'une plante ou partie de plante, dans lequel on inactive le  
30 gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

Il faut comprendre que l'augmentation de la taille des grains d'amidon et l'augmentation de la teneur en amidon ne sont pas nécessairement liées, à

savoir qu'*a priori* l'augmentation de la teneur en amidon n'implique pas obligatoirement une augmentation de la taille des grains d'amidon, et vice versa.

La présente demande montre l'existence d'une interaction entre  
5 l'amidon phosphorylase, l'amidon synthase, et les enzymes de branchement. La phosphorylase, le cas échéant en interaction avec une glycogénine (WO 03/014365), amorcerait l'initiation de l'amidon en fournissant l'amorce appropriée vis à vis des enzymes de branchement et de l'amidon synthase.

Sans pour autant être liés par cette théorie, on peut émettre une  
10 hypothèse pour expliquer l'augmentation de la taille moyenne des grains d'amidon dans les plantes dans lesquelles l'amidon phosphorylase est inactivée. Selon cette théorie, du fait de l'inactivation de la phosphorylase, seule l'amidon synthase (notamment SS 5 chez *Arabidopsis*, SS I chez le maïs) pourrait interagir avec la glycogénine et initier la synthèse d'amidon.  
15 L'interaction plus faible avec la glycogénine, voire également une expression plus tardive, résulterait en un retard dans l'initiation de la synthèse de l'amidon, et donc du nombre de granules produits (initiés). Comme le nombre de molécules d'amidon initiées est moins important mais que les substrats nécessaires à la synthèse de l'amidon sont présents au même niveau, on  
20 obtient des grains plus gros car utilisant la même quantité de substrat pour un nombre réduit de granules.

L'invention fournit également un procédé pour l'obtention de plantes ou parties de plante produisant des grains d'amidon de taille accrue, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les  
25 cellules de la plante.

L'invention fournit par ailleurs un procédé pour l'obtention de plantes, de tissus de plante ou parties de plante à teneur élevée en amidon, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

30 Le terme "tissu de plante" fait référence à n'importe quel tissu d'une plante, dans une plante ou dans une culture. Ce terme inclut des plantes entières, des cellules de plantes, des organes de plantes, des graines de

plantes, des protoplastes, des cals, des cultures de cellules et toutes autres cellules de plantes organisées en tant qu'unité fonctionnelle et/ou structurelle.

L'invention concerne aussi tout tissu de plante susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention ainsi que les plantes transgéniques le  
5 comprenant.

De plus, les graines issues des plantes obtenues selon l'un des procédés mentionnés selon l'invention caractérisées en ce qu'elles ont une taille accrue, et/ou une teneur en amidon modifiée rentrent dans le cadre de la présente invention.

10 Les « amidon phosphorylases », également connues sous le nom de « alpha-glucane phosphorylases », ont été décrites dans de nombreuses plantes, par exemple la fève, la pomme de terre (Swissprot P04045), la betterave, l'épinard, le maïs (WO 98/40503), le petit pois ainsi que le riz (EMBL n° d'accès D23280 ou Q9AUV8), et le blé (EMBL AAQ73181).

15 La séquence génomique (locus désigné AtPHO-1) codant pour l'amidon phosphorylase d'*Arabidopsis thaliana* est présentée en annexe (SEQ ID N° 1).

L'amidon phosphorylase est soumise à un adressage vers le plaste de la cellule.

L'homme du métier sait comment identifier les phosphorylases à  
20 inactiver par exemple par comparaison de séquences entre SEQ ID N°1 avec des séquences d'autres espèces en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) et le programme FastDB avec les paramètres par défauts. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and  
25 Applications, pages 127-149, 1988, Ala. R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence. Une autre méthode possible repose par exemple sur l'hybridation sélective dans des conditions de fortes stringence telles que définies dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61. En particulier il  
30 peut s'agir plus particulièrement de formes alléliques des enzymes citées ci-dessus. Les phosphorylases à inactiver sont de préférence adressées au plaste, c'est-à-dire dirigées vers le plaste. L'homme du métier est capable

d'identifier sur la séquence le motif correspondant au peptide d'adressage au plaste. Pour ce faire, il peut utiliser par exemple le logiciel Génoplante®Predotar (Small I. et al., 2004, Proteomics, vol 4.(6) 1581-1590 et accessible sur le site <http://www.genoplante.com>).

5 L'expression « teneur élevée en amidon » signifie que la plante transgénique obtenue fournit une quantité d'amidon supérieure à une plante de même espèce, non transformée.

« L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase » signifie que le gène est rendu non fonctionnel, c'est-à-dire qu'il ne permet plus ou  
10 pratiquement plus l'expression d'une protéine amidon phosphorylase active, la protéine n'étant plus ou pratiquement plus exprimée, ou alors sous une forme mutée non fonctionnelle, incapable d'exercer ses propriétés enzymatiques.

L'inactivation du gène peut être réalisée par tout moyen de l'homme du métier (voir Torneycroft et al., 2001), en particulier par interruption du gène, ou  
15 extinction de l'expression génique (« gene silencing »).

Selon un mode de réalisation préféré, on introduit une mutation dans le gène codant pour l'amidon phosphorylase, qui rend ce gène non fonctionnel, à savoir qu'il devient incapable d'exprimer l'enzyme, ou que l'enzyme produite est inactive.

20 En particulier, la mutation peut consister en une insertion de nucléotide(s), par exemple entre l'exon 6 et l'intron 6 du gène de l'amidon phosphorylase.

L'extinction du gène peut ainsi être réalisée par insertion d'ADN-T.

La séquence SEQ ID N° 2 montre ainsi le gène de l'amidon  
25 phosphorylase d'*Arabidopsis thaliana* dans lequel une séquence ADN-T est insérée.

L'invention se rapporte également à l'utilisation de la séquence polynucléotidique SEQ ID N°2 pour la fabrication d'une plante avec une taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon modifiée. La plante obtenue  
30 selon l'invention est choisie parmi la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

L'ADN-T a été utilisé comme mutagène dès la fin des années 80. Chez *Arabidopsis*, qui ne possède pas de transposons endogènes ayant une activité permettant de faire de la mutagenèse insertionnelle, il a été utilisé préférentiellement aux transposons. La bactérie du sol *Agrobacterium* a la  
5 capacité de transférer un morceau de son ADN, l'ADN-T, dans le génome nucléaire des cellules de plantes. Cette propriété est très utile pour inactiver des gènes par mutagenèse d'insertion. Les seuls éléments nécessaires sont des répétitions de 24 paires de base, les séquences bordures, qui délimitent la région à transférer. L'accroissement de l'efficacité des méthodes de  
10 transformation a facilité le développement de la génétique inverse.

L'infiltration sous vide de plantes entières a permis d'augmenter l'efficacité de transformation (4 à 5 transformants par plante traitée) de même que la reproductibilité. Récemment, la méthode a encore été simplifiée avec l'apparition du « floral dip ». Les inflorescences sont simplement trempées  
15 dans une suspension d'*Agrobacterium* en présence d'un surfactant, le Silwet L-77 et de saccharose. Avec ces différentes méthodes, tous les transformants obtenus sont hémizygotes pour l'ADN-T, ce qui suggère une transformation tardive au cours du développement floral. La cible de transformation a été identifiée comme étant l'ovule en développement. Les mutations létales à l'état  
20 homozygote sont maintenues dans la population sous forme de plantes hétérozygotes. On obtient en moyenne une à deux insertions par plante. Les analyses de ségrégation montrent que 57 % des transformants contiennent 1 locus d'insertion, 25 % 2 locus, 8 % 3 locus et 2 % plus de 3. Une analyse moléculaire des mutants étiquetés montrent que ces insertions se font au  
25 hasard, sont stables, maintenues dans la descendance et qu'il y a peu de biais d'insertions.

L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase endogène peut également être obtenue par mutagenèse des cellules de plante, par exemple par irradiation U.V, par un agent mutagène chimique, ou par insertion de  
30 transposons.

Les éléments transposables ont la capacité de perturber l'expression de gènes dans lesquels ils sont insérés et de générer des délétions, réarrangements, et mutations au locus cible.

Les transposons ont été les premiers agents insertionnels mutagènes utilisés chez le maïs puis chez le pétunia et *Anthirrhinum*. Contrairement à l'ADN-T, le transposon peut être excisé du gène disrupté en présence d'une transposase. La haute fréquence de réversion de la mutation qui en résulte permet de confirmer qu'elle est induite par le transposon. La remobilisation des transposons permet aussi de générer des mosaïques : un mutant homozygote qui porte une transposase active aura des secteurs somatiques qui ont perdu le transposon Ds et restauré la fonction du gène. Ceci permet de déterminer le site d'action d'un gène en combinaison avec son patron d'expression. D'autre part, pour les transposons de type Ac/Ds, la plupart des événements de transposition se produisent à des sites génétiquement liés. S'il existe un élément transposable près d'un gène d'intérêt, il pourra donc être remobilisé pour se réinsérer dans le gène ou à proximité (Ito et al, 1999). Il est ainsi possible de faire de la mutagenèse locale dans une région d'intérêt particulier.

Une technique de mutagenèse par transposons qui peut être avantageusement utilisée est la mutagenèse par transposon Mutator confirmée par un criblage en génétique inverse (Bensen et al., 1995 ; Das et al., 1995). Cette technique met en œuvre les étapes consistant à croiser une lignée "Mutator" avec des hybrides des plantes d'intérêt puis à cribler les plantes F1 obtenues par PCR avec une amorce spécifique des transposons et une amorce spécifique de la séquence nucléotidique codant pour l'amidon phosphorylase. Les graines F2 obtenues à partir des plantes criblées F1 permettent d'obtenir des plantes dont le phénotype est alors analysé.

Une autre méthode pour inactiver le gène de l'amidon phosphorylase est l'injection locale d'ARN double brin (RNA interference : RNAi) (Fire, 1999). Les ARN double-brin sont clivés en petits ARN sens et antisens de 22 nucléotides environ qui vont cibler la dégradation des ARNm endogènes homologues (Zamore et al., 2000). L'expression constitutive d'ARN double brin par un transgène mettant en jeu des séquences inversées répétées placées sous le

contrôle du promoteur 35S permet d'obtenir une inactivation efficace dans l'ensemble de la plante, y compris dans le méristème (Waterhouse et al., 1998). Cette stratégie est très efficace tout au long du développement des plantes.

5 L'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase endogène peut être par ailleurs réalisée selon le procédé comprenant les étapes consistant à :

- a) fournir un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique antisens du gène codant pour ladite amidon phosphorylase endogène;
- 10 b) transformer une cellule de plante avec ledit vecteur d'expression ;
- c) régénérer la plante à partir de la cellule transformée à l'étape b, ladite plante transgénique ainsi obtenue présentant des grains d'amidon de taille accrue, d'une teneur en amidon élevée.

15 Une autre possibilité pour réduire l'activité de l'amidon phosphorylase dans les cellules des plantes est d'exprimer des ribozymes qui sont des molécules d'ARN qui agissent comme des enzymes catalysant spécifiquement le clivage des transcrits codant pour l'amidon phosphorylase, par des techniques connues de l'homme du métier (EP 321 021).

20 Il est également possible d'obtenir une plante présentant une altération de l'expression d'amidon phosphorylase par le procédé dit "transwitch" décrit dans WO90/12084.

L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase peut également être obtenue en infectant les plantes par des virus recombinants dans lesquels une partie de la séquence codante ou du promoteur du gène à inactiver a été  
25 introduite (virus-induced gene silencing ou VIGS) (Ratcliff et al., 2001). Pour expliquer ce phénomène, on pense que les molécules virales de polarités positives et négatives produites au cours du cycle de réplication du virus sont reconnus comme des ARN double brin et dégradées en petits ARN sens et antisens de 22 nucléotides qui vont à leur tour déclencher la dégradation des  
30 ARNm endogènes homologues. Toutefois, seuls les ARNm endogènes sont totalement dégradés alors que les ARN viraux restent détectables. La présence de petits ARN de 22 nucléotides dérivés des ARN viraux, suggère que les virus qui induisent le VIGS sont également capables d'y résister. Les avantages de



cette méthode sont avant tout sa simplicité et la rapidité de sa mise en oeuvre. De plus, il suffit de cloner 23 paires de base d'un gène dans le virus pour cibler spécifiquement son inactivation.

5        La construction des vecteurs d'expression utilisés (portant par exemple une séquence antisens du gène de l'amidon phosphorylase endogène) ou des ARNi est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standard.

      La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs ou des acides nucléiques dans les protoplastes, notamment  
10    après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol en présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

      La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm et *al.*, 1986.

15        La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Sanford, (1988).

20        Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

      Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par biolistique, c'est-à-dire par projection, au moyen d'un canon à particules, de microparticules  
25    recouvertes des séquences nucléotidiques à transférer (J. Finner, 1992).

      Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt  
30    initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

      Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article

d'An et al., 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-  
5 chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al.).

Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection  
10 dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

Parmi les terminateurs de transcription pouvant être utilisés, on peut  
15 citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck et al., (1980), ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

20 Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer notamment :

- le promoteur 35S, ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;
- le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant  
25 l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue ;
- les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993) et permettant une  
30 expression spécifique dans les graines ;
- le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium*

*tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1991 ;
- le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge ;
- le promoteur du gène de  $\gamma$ zéine de maïs (Pyzéine) contenu dans le plasmide py63, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.

10

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées conformément à la présente invention, on peut citer celles de la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

La présente invention permet aussi d'obtenir une plante ou partie de plante telle que notamment la pomme de terre, le blé, le maïs ou le riz, produisant des grains d'amidons de taille accrue, ou une teneur élevée en amidon.

Par « partie de plante », on entend notamment les organes de réserve naturellement riches en amidon, tels que les graines ou les tubercules. Par « partie de plante », on entend également les cellules de ladite plante.

20

L'extraction de l'amidon produit peut être réalisée selon les techniques standard connues de l'homme du métier. La solubilisation de l'amidon est également connue de l'homme du métier et peut être réalisée par trempage et fractionnement du grain d'amidon, ou par exemple par chauffage. De manière alternative, on peut utiliser des enzymes déstructurent l'amidon, telles que les amylases.

25

L'amidon produit peut également être utilisé dans de nombreuses industries : industrie du papier et du carton, industrie des adhésifs, industrie textile, industrie pharmaceutique (pour la formulation des médicaments), etc.

30

L'amidon produit peut également subir d'autres modifications, en particulier des modifications chimiques telles qu'un traitement acide, une oxydation, une estérification, etc avant son utilisation.

Cet amidon peut être utilisé pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

### **LEGENDE DES FIGURES :**

La figure 1 est un schéma représentant le génome d'*Arabidopsis thaliana*.

La figure 2 est un graphe montrant les niveaux relatifs d'accumulation d'amidon dans la lignée mutante par rapport à la lignée sauvage de référence (WS).

La figure 3 est une comparaison de profils d'analyse spectrophotométrique d'amidon des lignées sauvage et mutante après chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B.

La figure 4 est une comparaison de photographies de vues au microscope électronique à transmission, de grains d'amidon (agrandissement x3000).

### **EXEMPLES :**

#### **1. Description de la lignée mutante:**

Les inventeurs ont étudié les phénotypes d'une lignée mutante d'*Arabidopsis thaliana*, produit par interruption d'un gène de l'amidon phosphorylase (locus désigné AtPHO-1).

Cette lignée (DDS72) est l'une des 50 000 lignées mutantes produites par insertion aléatoire d'ADN-T, comme décrit par Balzuergue et al., 2001.

La lignée mutante DDS72 d'*Arabidopsis thaliana* étudiée présente une insertion d'ADN-T à la jonction de l'exon 6 et de l'intron 6 (cf figure 1 et SEQ ID N° 2).

## 2. Analyse enzymologique de la lignée mutante :

Afin de déterminer l'impact de l'insertion de l'ADN-T au locus AtPHO-1 sur l'activité des amidon-phosphorylases, les inventeurs ont effectué des zymogrammes à partir d'extraits cellulaires de diverses lignées mutantes et sauvages (WS). Les zymogrammes ont été réalisés dans deux conditions différentes.

### - Extraction des protéines des feuilles

Les feuilles sont broyées à 4°C à l'aide du Polytron Blender dans le tampon suivant : 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl. Le broyat est centrifugé 5 minutes à 13000 rpm à 4°C et on récupère le surnageant contenant les protéines solubles.

### - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les gels sont réalisés avec les chambres d'électrophorèse MiniProtean II commercialisés par BioRAD (Richmond, CA, USA). Les gels ont une épaisseur de 1,5 mm. La concentration finale en monomère est de 7,5% (p/v) pour le gel de séparation, il contient également 0,45% de glycogène de foie de lapin ou 0,2% d'amidon de pomme de terre. Il est tamponné par le Tris/HCl 110mM pH 7,2. Le gel de concentration à 2,5% final en monomère est tamponné par le Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 60mM pH 7,3. Le tampon de migration utilisé pour l'électrophorèse est le Glycine/Tris 40mM pH 8,5.

A 100 µg d'extrait protéique, sont ajoutés 10 µl de Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 60mM pH 7,3 et 20 µl de tampon de chargement : saccharose 25% (p/v), bleu de bromophénol 0,001%.

La migration se déroule à 4°C durant 2h30 à 15mA et 250V. A l'issue de celle-ci, le gel est équilibré dans le Citrate/NaOH 100mM pH 7,0 pendant 10 minutes avant d'être incubé toute la nuit à température ambiante dans le citrate/NaOH 100mM pH 7,0, Glucose-1-phosphate 50 mM.

A cette concentration, les phosphorylase fonctionnent dans le sens de la synthèse des polysaccharides en ajoutant un résidu de glucose en extrémité non-réductrice des glycanes disponibles par l'intermédiaire d'une liaison α-1,4. L'activité est ensuite révélée par coloration du gel à l'iode.

C'est la forme de migration rapide (sur glycogène ou amidon) qui disparaît totalement dans le mutant au locus AtPHO-1.

### 3. Impact de la mutation sur le polysaccharide de réserve :

#### - Extraction d'amidon des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

Les feuilles d'*A. thaliana* sont prélevées en fin de photopériode puis rincées deux fois dans un grand volume d'eau désionisée (afin de retirer les débris non désirés). Dans la glace, on broie le matériel dans 15-25 ml de tampon d'extraction (MOPS 100 mM pH 7.2, EDTA 5 mM, Ethylène glycol 10%) à l'aide du Polytron Blender (broyeur de tissus) jusqu'à obtenir un extrait bien homogène sans aucun tissu intact. On passe l'extrait 4 x 15 secondes au sonicateur « continu » et entre chaque sonication, on plonge le tube dans la glace. Centrifuger 15 minutes à 3200 g à 4°C. Le culot est repris dans 20 ml de Percoll (Amersham Biosciences) à 90% et centrifugé 40 minutes à 10000 g dans un tube en verre de type Corex. On retire les débris en surface et le surnageant. Le culot d'amidon est rincé cinq fois par de l'eau désionisée avant son analyse.

#### - Dosage de l'amidon

L'amidon est dosé à l'aide du kit Enzytec commercialisé par Diffchamb (Lyon, France). Les glucanes sont digérés par une amyloglucosidase qui hydrolyse les liaisons O-glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6. Les molécules de glucose ainsi libérées sont ensuite phosphorylées en position 6 par une hexokinase. Le glucose-6-phosphate produit est ensuite oxydé en gluconate-6-P par une G6P déshydrogénase en réduisant le NADP en NADPH. Cette dernière réaction est suivie au spectrophotomètre à 365 nm.

La quantité d'amidon dosée est présente au tableau 1 :

Tableau 1 :

Lignée	Quantité d'amidon (en mg/g de feuilles)
<u>WS (lignée sauvage)</u>	1,16
AtPHO-1 (lignée DDS72)	2,78

La figure 2 présente les niveaux relatifs d'accumulation d'amidon dans les différentes lignées par rapport à la lignée sauvage de référence (WS).

La structure de l'amidon est ensuite analysée par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B.

5       - Fractionnement de l'amidon

Le fractionnement est réalisé par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B (Amersham-Biosciences, Suède).

La colonne possède un diamètre interne de 0,5 cm et une hauteur de 65 cm. Equilibrée dans la soude 10 mM, son débit est de 12 ml/heure. La  
10       préparation de l'échantillon d'amidon est effectuée comme suit : on dissout 1,5mg d'amidon natif dans 200 µl de DMSO 100% à 100°C pendant 10 minutes. Le polysaccharide est ensuite précipité par 4 volumes d'éthanol pur à -20°C pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, le culot d'amidon est dissous dans 500 µl de soude 10 mM puis déposé sur la  
15       colonne. Les fractions de 300 µl sont analysées par spectrophotométrie à l'iode.

- Détermination de la  $\lambda_{\max}$  du complexe iode-polysaccharide :

La longueur du maximum d'absorbance du complexe formé par l'iode avec les polysaccharides est déterminée par spectrophotométrie. 100 µg  
20       d'amidon sont dissous dans le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) 100% durant 10 minutes à 100°C. Cette solution est ensuite ramenée à 10% en DMSO. A 400 µl de cette solution, sont rajoutés 100 µl d'une solution d'iode 0,02% I<sub>2</sub> et 0,2% KI. Le spectre d'absorption est réalisé entre 400 et 700 nm.

On peut également déterminer les quantités de polysaccharides  
25       présentes dans chaque fraction à l'aide du kit de dosage Enzytec.

Il ne semble pas y avoir de modification particulière de la structure de l'amidon de la lignée mutante AtPHO-1 si on fait la comparaison entre les deux profils présentés à la figure 3.

#### 4. Analyse de la structure de l'amidon accumulé par la lignée AtPHO-1 par microscopie électronique :

##### - Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission

5 Les échantillons sont inclus dans l'agar à 3% dans l'eau. Ils sont ensuite traités au PATAg : acide périodique-thiosemicarbazide-argent avec un temps d'incubation de 20 minutes dans l'acide périodique. On réalise ensuite une inclusion dans une résine hydrophile (nanoplast) pendant 10 jours avant de consolider la préparation par une inclusion dans une résine LR-White Hard  
10 grade. Les coupes sont effectuées à l'ultramicrotome (microme MT-7000) avec une épaisseur de 60 à 100 nm. Les observations sont effectuées au MET (Jeol 100S) à 80keV (figure 4).

Les images obtenues ont été analysées en repérant les paramètres suivants :

- 15
- surface totale,
  - diamètre équivalent,
  - rapport des différentes longueurs.

Les valeurs sont traitées grain par grain.

S'agissant de la lignée sauvage, les tailles sont très variées : on note la  
20 présence importante d'assez gros grains mais aussi de quelques très petits. Sur 556 grains analysés, le diamètre équivalent moyen est de 1.27  $\mu\text{m}$ . Les grains de forme allongée semblent majoritaires.

S'agissant de la lignée mutante, les grains sont de grosse taille et de formes plus arrondies (convexes) avec une présence de grains anguleux.  
25 grains ont été analysés.

L'analyse statistique montre que les grains d'amidon de la lignée mutante au locus AtPHO-1 sont en moyenne plus gros que ceux de la lignée sauvage.

Ainsi, deux modifications majeures sont observées en ce qui concerne  
30 l'amidon dans la lignée mutante au locus AtPHO-1 chez *A. thaliana* :

1) une augmentation de la taille moyenne des grains d'amidon dans la lignée mutante,



2) une augmentation significative de la quantité d'amidon accumulée dans les feuilles.

5                   **5. Interaction entre l'amidon phosphorylase, l'amidon synthase, et les enzymes de branchement :**

La phosphorylase est l'une des premières enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon ; qui apparaît dans les amyloplastides de l'endosperme du maïs. L'enzyme continue à présenter tout au long du processus de biosynthèse de l'amidon et est la seconde enzyme la plus abondante dans ce processus (après l'enzyme IIb de branchement). Des études de zymogrammes sur gels natifs ont permis d'identifier une zone où trois activités différentes sont présentes (amidon synthase soluble SSS ou SS ; enzymes de branchement SBE, et phosphorylase), suggérant l'existence d'un complexe incluant les enzymes responsables de ces activités. De plus le fractionnement enzymatique couplé à des zymogrammes a montré une interaction entre l'amidon phosphorylase et les enzymes de branchement.

Ces zymogrammes ont fait appel aux conditions suivantes :

Le principe des zymogrammes est de soumettre les enzymes à une séparation par électrophorèse, les gels d'électrophorèse étant ensuite trempés dans une solution déclenchant la réaction enzymatique là où l'enzyme a migré.

Pour révéler l'amidon phosphorylase, la solution mise en contact avec le gel contient du glucose 1-phosphate, substrat de l'enzyme. La réaction enzymatique produit la génération et l'élongation de glucane linéaire. Les bandes bleues apparaissent là où l'enzyme a migré.

Pour révéler l'amidon synthase, la solution mise en contact avec le gel contient de l'amylopectine et de l'ADP-glucose, substrats de l'enzyme. La réaction enzymatique produit l'élongation des chaînes d'amylopectine avec l'ADP-glucose. Les bandes bleues apparaissent là où l'enzyme a migré.

Pour révéler les enzymes de branchement (SBE), la solution mise en contact avec le gel contient du glucose 1-phosphate, substrat de l'enzyme, et une phosphorylase b exogène (de lapin). La réaction enzymatique produit la génération et l'élongation de glucanes linéaires avec le glucose 1-phosphate,

glucanes qui sont branchés par les SBE. Des bandes brunes apparaissent là où l'enzyme a migré.

D'autres études chez des mutants du maïs et des maïs doubles transgéniques (a/aSBE2b et a/s SSI) ont montré que le domaine des activités enzymatiques multiples observé sur les gels natifs était composé d'au moins la SSI, SBE2b et la phosphorylase. Sans être liés par cette théorie, il est probable au vu de l'interaction de la phosphorylase avec les enzymes directement impliquées dans la biosynthèse d'amidon, que l'amidon phosphorylase est impliquée également dans la biosynthèse de l'amidon.

En raison de l'existence de ce complexe et parce que la phosphorylase apparaît de manière précoce par rapport à l'AGPase ou la SSI dans l'endosperme de maïs, on peut émettre l'hypothèse que l'amidon phosphorylase, en utilisant la glucose 1-phosphate, génère une chaîne naissante de polymère de glucose qui agirait comme amorce pour les activités des enzymes SBE2b et SSI dans l'amyloplaste du maïs.

#### 6. Vérification de la compartimentation subcellulaire de PHO1 :

Il existe, outre PHO1, une deuxième phosphorylase chez *Arabidopsis thaliana* : PHO2.

D'après les prédictions bioinformatiques, la localisation subcellulaire de PHO2 serait restreinte au cytosol de la cellule, tandis que PHO1 serait dirigée vers le chloroplaste. Pour confirmer la localisation subcellulaire de PHO1, les inventeurs ont procédé à une purification des chloroplastes, suivie d'un zymogramme des activités phosphorolytiques, c'est-à-dire en suivant l'activité d'une forme cytosolique de  $\beta$ -amylase (Zeeman et al., 1998) correspondant au gène At4g15210 (gène *ram-1* décrit dans Laby et al., 2001).

##### a) purification des chloroplastes :

La purification des chloroplastes a été réalisée en suivant un protocole standard :

Des plantes âgées de trois à quatre semaines ont été laissées dans le noir complet à 4°C pendant 48 heures. Les feuilles (10 g) ont été recueillies à

4°C et homogénéisées dans 200 ml de sorbitol 330 mM, MES 25 mM, pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, isoascorbate 2 mM (tampon de purification). L'homogénat a été filtré à travers trois couches de Miracloth et centrifugé 3 minutes à 2500 g à 4°C. Le supernageant correspond à la fraction enrichie en cytosol (CytoEF). Le  
5 culot (contenant les chloroplastes) a été resuspendu dans 500 µl du même tampon et chargé sur un gradient discontinu de Percoll : 2 ml de Percoll 65% (fond du tube), 2 ml de Percoll 45%, 2 ml de Percoll 20% (haut du tube). L'échantillon a été centrifugé pendant 30 minutes à 4200 g et 4°C. Le culot formé à l'interface entre les couches de Percoll à 45% et 65% a été recueilli et  
10 dilué dans deux volumes du tampon de purification puis centrifugé à 1800 g à 4°C pendant 2 minutes. Le culot a ensuite été lavé deux fois dans le même tampon et resuspendu dans 200 µl du tampon de purification.

b) Zymogramme :

15 Le gel de polyacrylamide (7,5%) contient du glycogène de foie de lapin (0,6%). Les puits ont été chargés avec 100 µg de protéines et l'extrait a été soumis à une migration à 4°C en conditions natives à raison de 15 mA/gel pendant 2 heures. Le gel a ensuite été incubé pendant une nuit à température ambiante dans un milieu tamponné (Citrates de sodium 100 mM pH 7,0 +  
20 Glucose 1-phosphate 20 mM). Le gel a enfin été immergé dans une solution d'iode qui permet de révéler les zones où des activités enzymatiques ont modifié la structure de l'amidon (les zones non soumises à l'action d'enzymes de modification se colorent en orange).

25 Les résultats confirment que PHO1 est localisée dans le stroma du chloroplaste tandis que PHO2 est une protéine exclusivement cytosolique.

**BIBLIOGRAPHIE**

- An G. (1986), Plant Physiol. 81 : 86-91
- 5 - Balzergue et al. (2001) Bio Techniques, Vol 30, 496-504
- Bensen et al. (1995), The Plant Cell, Vol. 7, 75-84
- Das et al. (March 1995), The Plant Cell, Vol. 7, 287-294
- 10 - Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573
- Finner J. et al. (1992), Plant Cell Reports, 11, 323-328
- 15 - Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811
- Franck et al. (1980) Cell. 21,285-294
- Fromm et al. (1986) Nature, vol. 319, 791-793
- 20 - Gaubier et al. (1993) Mol. Gen., 238, 409-418
- Ito et al. (1999) Plant J., Vol 17, 433-44.
- 25 - Jouanin (1987) Plant. Sci., 53, 53-63
- Kay (1987) Science, 236, 1299-1302
- Laby et al., (2001) Plant Physiol., 127(4) :1798-807
- 30 - Mc Elroy (1991) Mol. Gen. Genet. 231 : 150-160
- Ni et al. (1995) Plant J., 7, 661-676

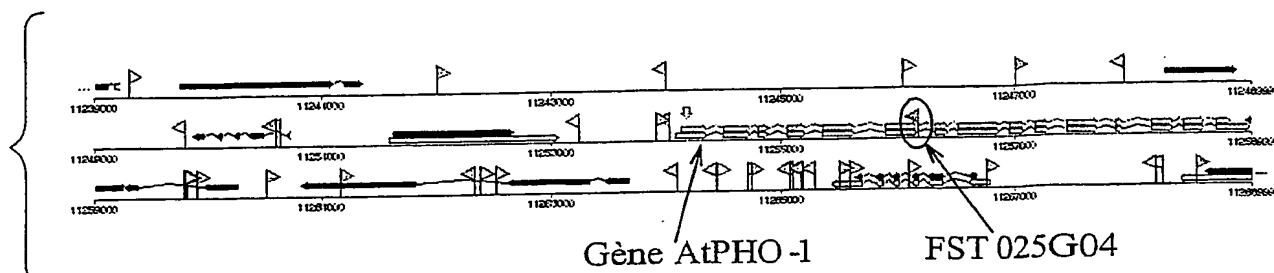
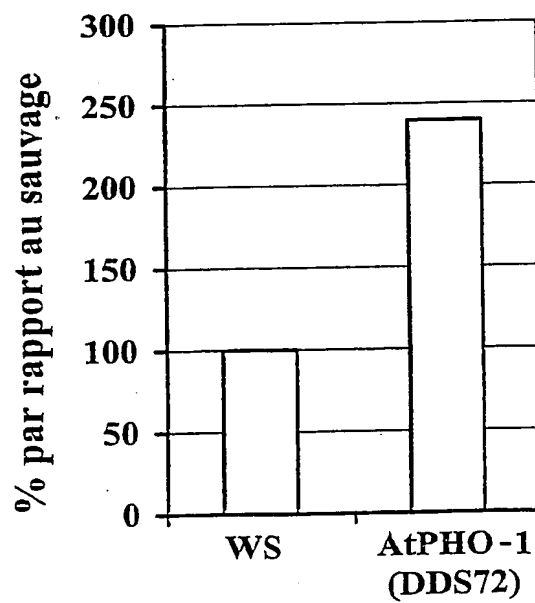
- Ratcliff et al. (2001) Plant J. 25, 237-245
- Ruiz et al. (1998) Plant Cell 10, 937-946
- 5 - Sanford J.C., (1988) Trends in Biotechnology, 6, 299-302
- Sonnewald et al., (1995) Plant. Mol. Biol. 27, 567-576
- 10 - Thorneycroft et al., (2001) Journal of Experimental Botany, 52, 361 :1593-1601
- Waterhouse et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 13959-13964
- 15 - Watson et al. ADN recombinant, Ed. De Boeck Université, p 273-292
- Zamore et al., (2000) Cell 101, 25-33 Ecole thématique Biologie végétale – 2001
- 20 - Zeeman et al., (1998) Plant. Cell., 10(10) :1699-712

## **REVENDEICATIONS**

1. Procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon d'une plante ou d'une partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.  
5
2. Procédé pour l'obtention de plantes ou parties de plante produisant des grains d'amidon de taille accrue ou à teneur élevée en amidon, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.  
10
3. Procédé selon la revendication 2, comprenant les étapes consistant à inactiver, par insertion de nucléotide(s), le gène codant pour ladite amidon phosphorylase endogène dans une cellule de plante, et régénérer la plante à partir de la cellule transformée, ladite plante transgénique ainsi obtenue présentant des grains d'amidon de taille accrue, et/ou une teneur en amidon élevée.  
15  
20
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la plante est la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.  
25
5. Cellule végétale susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendication 2 à 4.
6. Plante transgénique comprenant une cellule végétale selon la revendication 5.  
30

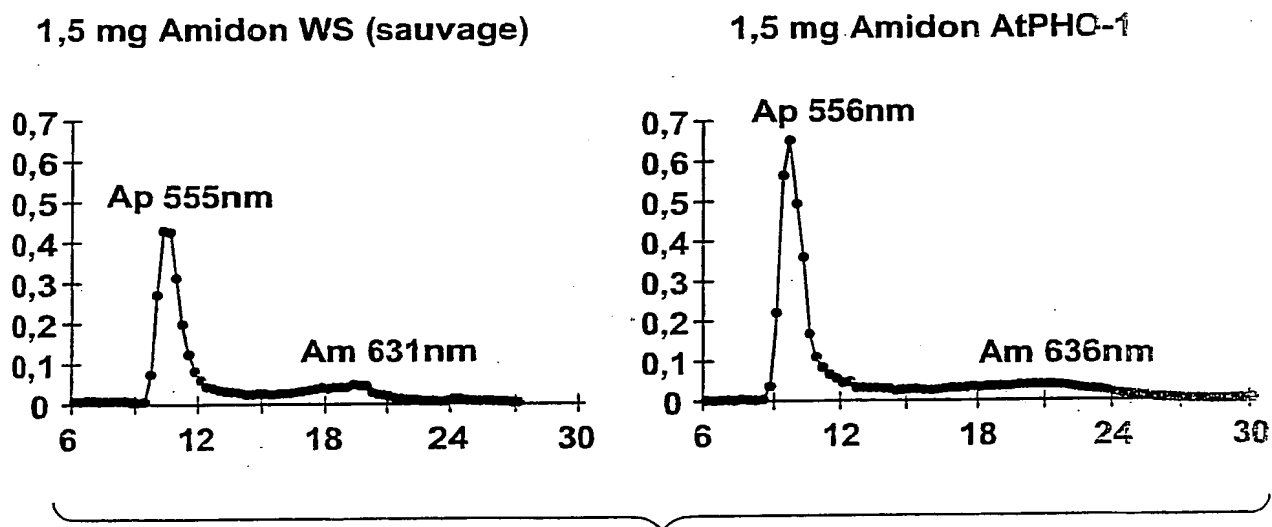
7. Graine issue de la plante selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle a sa taille accrue, et/ou une teneur en amidon modifiée.
- 5 8. Utilisation de la séquence polynucléotidique SEQ ID N°2 pour la fabrication d'une plante avec une taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon modifiée.
- 10 9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que la plante obtenue est choisie parmi la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

1/3

**FIG.1****FIG.2**

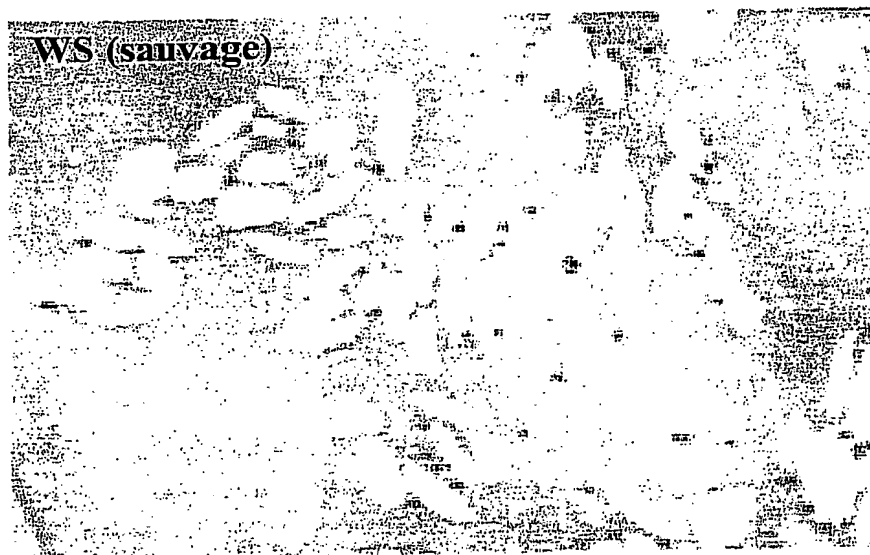


2/3

FIG.3

3/3

FIG.4



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GENOPLANTE-VALOR-SAS

&lt;120&gt; Procédé d'amélioration des plantes

&lt;130&gt; BET 05P0304

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4717

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 1

atggatcacga tgcgaatctc cgggtgtatca accggagctg aggtttttaat acaatgcaat	60
tccttatcaa gcctcgtttc tcgtcgttgc gacgacggaa aatggcgaac gagaatgttt	120
ccggcgagaa acagagactt gcgtccatcg ccgacgagaa gatccttttt gtcggtgaaa	180
tctatctcta gcgaaccgaa agccaaagta accgacgcag ttctcgattc cgaacaaggt	240
ctcattctaa tacttgcttt ctaataagaa ttagggtagc gaatttgaat tttatagtga	300
atgttgtgaa gtaactgatt cgtattcctt gggattttgt ttttgtgttg attgattttc	360
agaagtgttt attagctcga tgaatccgtt tgcgccagat gctgcttcgg tagcttcgag	420
tatcaagtac cacgcggagt ttacgccatt gtttccaccg gagaagtttg agttgccaaa	480
ggcgttcttt gcgactgcgc aaagtgttag agatgctttg atcatgaatt ggaatgcaac	540
ttatgagtat tacaacagag tgaatgtgaa acaagcgtat tatttgtcaa tggagttttt	600
gcaggttttg gtttttactc atttctttga gtgattttgt tcttggttgt tatctaacta	660
ttttacattg tagggtagag ccttatcgaa tgccgtgggt aacctgggc ttaatagcgc	720
ttatggtgat gctttgaaga ggcttggttt tgatttgaa agcgtggcta gtcaggtgag	780
ttgttaacca tggtgattat tatgcattaa ccgatgttta ttactaacag acgtcttaga	840
gatgatcgtc tttgcgagtc tattgtttgg ttttacagag ctgttatctt ctttatatgt	900
actgagatgc tagatacttc acttccattt tgtaggagcc agatcctgca cttgggaatg	960
gtggactcgg gagacttgcc tcgtgttttt tggattccat ggcaactttg aattatccgg	1020
cttggggtta tggacttaga tacaagtatg gcttgttcaa acagagaatt acaaaagatg	1080
gacaggagga agctgcagaa gattggcttg aggtcttatt ctcttattct tttctcatac	1140
agcgtttgct attgaacagt atttcctaatt ttgtactctc ttgtagcaat gctgagcagt	1200
ggacatgttt attggcttac ctgtttcttt cagctaagca atccttggga aatagtcaga	1260
aatgatgtct catatcctat taagttctat gggaaagtgg tttttggatc agatggtaag	1320

aaacgggtgga ttggtggaga agacattggt gctgttgctt atgatgttcc tatacctggt 1380  
tataaaacta agacaactat caatctgcgg ctctgggtcaa caaaagctcc ttccgaagat 1440  
tttgatttat cttcatataa ctctgggaag catactgagg cagcagaagc tctattcaac 1500  
gctgaaaagg ttgtatctt cattaagttt catttaaagt tgctttcaca attttgtttt 1560  
ttcgaccatg atctatttac aagatccttc tagtaattgg aatagtgcac atatctttaa 1620  
aattgagtga gaaccagcag aaatgaatat gttatcacag agagattagt cttgcgtcac 1680  
ttgtgcttgt ttatataacg agcttttgat gtgtatatac tgaaaagtgg ttgttttctt 1740  
cccttccctc ctgatggaat tagatttgct tctgtcttta ccccgagat gagtcaactg 1800  
aaggaaaggc tcttcgtctg aagcaacaat aactctgtg ctcagcctcg ctacaagata 1860  
tcgtagcacg ttttgagaca aggtctggag gaaacgtcaa ctgggaagaa tttccagaga 1920  
aggttgcagt gcagatgaat gacactcacc ctaccctatg cattcctgag ctaatgagga 1980  
ttctaattga tttaaaagga ctaagctggg aagacgcttg gaaaatcaca caaagggtact 2040  
aaaaatgact gaactaattg tcgggcatgc tacatatgtg tctatttggt cctatattta 2100  
gtctctggtg cttgtcccaa ataaaagata gtttacaaga atgaaacctg caacgtgttt 2160  
ctcaaaagt ttaataatttt ttaggactgt ggcatacaca aaccatacag tcttgctga 2220  
ggcactggag aagtggagtt tagaactcat ggagaaattg cttcctcgtc atgtggagat 2280  
tatcgaaaag attgatgagg aggtcatccc tgaacaacat atcaaagtgc tcttctattt 2340  
ttttcatatc gggcttaatt tgtactttca tgtattgcag ctagttcgca caattgtttc 2400  
agagtatggc accgcggatc ctgacttact tgaagaaaaa ctgaaggcaa tgaggatctt 2460  
ggaaaatgtc gaggttgcctt ctgcctttgc agatgtgatc gtgaagccgg tgaacaaacc 2520  
agttactgca aaagatgctc aaaatggcgt gaaaacggaa caagaagagg aaaaaactgc 2580  
tgagaggaa gaggaagacg aagttatccc agaaccaaca gtagaacccc ccaagatggt 2640  
ccgtatggcc aaccttgctg ttgtgggtgg tcatgctgta aatggcgttg cagagataca 2700  
cagtgaata gtgaagcagg acgtgtttta tgatttcgta caggtaaaca ttctaactag 2760  
tgaagcatga tgctataaaa tgctctacag ggaagaacac aactctcatc gttcaatatt 2820  
ctatattttt tgcagttgtg gccagaaaaa tttcagaaca aaacaaatgg agtaacacca 2880  
aggcgatgga ttcgtttttg caaccatata ttaagtata ttataactaa ctggataggc 2940  
acagaagact gggctttaa taccgaaaag gttgcggaac taagaaaggt atgtacttta 3000  
tcagattcaa tgttgtttca catgctgtta tctttattgg gcgacattgg ttatcattgt 3060  
ttgtctttc tccagtttgc agataatgaa gatctccaat ctgagtggag ggcagcaaag 3120

aagaagaaca agttgaaggt tgtatcactt atcaaggaaa gaactggata tactgtcagc 3180  
cccgatgcaa tgttcgacat tcagggtcagt tccaatggat cttgggttact tttagattga 3240  
tgagttgttt gcttgggttt ttcgggttga gaagtccttt acgcaactct gagtagctta 3300  
tgtagattct tttctttttg cattgaaaac tttttgcaga tcaagcgtat acatgagtac 3360  
aagcgacaac tgctaaatat cttgggaatt gtttaccgct acaaaaagat gaaggaaatg 3420  
agtgtagtgt agagagagaa agcatttggt ccaagagttt gcatatttgg gggaaaagca 3480  
tttgccacat atgtgcaagc taagagaatt gttaaattta tcacagatgt tgcgtctaca 3540  
attaaccatg atccagaaat aggtgacctc ctttaaggat atatctactt acgttcttgt 3600  
attagtcgta ttctcaagcg tataacggaa aatctgcaat aattatctgg tttttgcac 3660  
tgtggagatt ggcacttact aattagaagt gttaactaaa catgtaggtt atctttgttc 3720  
ctgattacaa tgtcagtggt gctgaattgc tcattccagc aagtgtgctt tctcagcaca 3780  
tcaggtaaaa acttcttttg cttagtcaca ttatagtttt tggtcacaac tccatgaagt 3840  
taaaatattg aaattgagat aaccggtaaa ccatgaactg gactagtctt tcttttttct 3900  
ataagaactt tagaaacaaa tcctgacaca aggaacaata tgtttcgggt acatttatga 3960  
aaggttataa tcaatggcac tcatactttt tgctggagac taagagtctt tctctgcagt 4020  
actgttggga tggaagctag tgggacaagc aacatgaaat tttcgatgaa cggttgcgtt 4080  
ttgattggaa ccttggatgg ggcgaaatgc gagattagag aagaagttgg agaagaaaat 4140  
ttcttctctt ttggtgocaa agctgatcag attgtgaacc tcaggaagga gagagcagag 4200  
ggaaaggtat atactatttg aagagttaac cttaccatgc ttctgtttta gcatcaacaa 4260  
gaatttgatt tttgacctgg ctcttggcat tccagtttgt tcccgatcct acttttgaag 4320  
aagtcaagaa gtctgttggga agcggcgtct ttgggtcaaa tagctatgat gaactaatcg 4380  
gctctttgga aggaaacgaa ggctttggac gagcggatta cttcctagtt ggcaaagact 4440  
ttcctagtta catcgaatgc caagaaaaag tcgacgaggc ataccgagac cagaaagtaa 4500  
gtactaatgc attttctttg aacatcaagc taataatggt gactaaaata tgaaacttac 4560  
tcaaatatca aacottgaaa ttgctgttaa atgattacag agatggacga gaatgtcaat 4620  
aatgaacaca gcaggttcat tcaagtttag cagtgaccgg acgatccacg aatacgccaa 4680  
agacatatgg aatattaagc aagtggaaact tccatga 4717

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 10870

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

<221> misc\_feature  
<222> (2040)..(8192)  
<223> séquence ADN-T

<400> 2  
atggatacga tgcgaatctc cggtgtatca accggagctg aggttttaac acaatgcaat 60  
tccttatcaa gcctcgtttc tcgtcgttgc gacgacggaa aatggcgaac gagaatgttt 120  
ccggcgagaa acagagactt gcgtccatcg ccgacgagaa gatccttttt gtcggtgaaa 180  
tctatctcta gcgaaccgaa agccaaagta accgacgcag ttctcgattc cgaacaaggt 240  
ctcattctaa tacttgcttt ctaataagaa ttagggtagc gaatttgaat tttatagtga 300  
atgttgtgaa gtaactgatt cgtattcctt gggattttgt ttttggttg attgattttc 360  
agaagtgttt attagctcga tgaatccgtt tgcgccagat gctgcttcgg tagcttcgag 420  
tatcaagtac cagcgggagt ttacgccatt gttttcaccg gagaagtttg agttgccaaa 480  
ggcgttcttt gcgactgcgc aaagtgttag agatgctttg atcatgaatt ggaatgcaac 540  
ttatgagtat tacaacagag tgaatgtgaa acaagcgtat tatttgtcaa tggagttttt 600  
gcagggtttg gtttttactc atttcttga gtgattttgt tcttggttg tatctaacta 660  
ttttacattg tagggtagag ccttatcgaa tgccgtgggt aaccttgggc ttaatagcgc 720  
ttatggtgat gctttgaaga ggcttggttt tgatttgga agcgtggcta gtcaggtgag 780  
ttgttaacca tgttgattat tatgcattaa ccgatgttta ttactaacag acgtcttaga 840  
gatgatcgtc tttgcgagtc tattgtttgg ttttacagag ctgttatctt ctttatatgt 900  
actgagatgc tagatacttc acttccattt tgtaggagcc agatcctgca cttgggaatg 960  
gtggactcgg gagacttgcc tcgtgttttt tggattccat ggcaactttg aattatccgg 1020  
cttggggtta tggacttaga tacaagtatg gcttgttcaa acagagaatt acaaaagatg 1080  
gacaggagga agctgcagaa gattggcttg aggtcttatt ctcttattct tttctcatac 1140  
agcgtttgct attgaacagt atttcctaatt ttgtactctc ttgtagcaat gctgagcagt 1200  
ggacatgttt attggcttac ctgtttcttt cagctaagca atccttggga aatagtcaga 1260  
aatgatgtct catatcctat taagttctat gggaaagtgg tttttggatc agatggtaag 1320  
aaacggtgga ttggtggaga agacattggt gctgttgctt atgatgttcc tatacctggt 1380  
tataaaaacta agacaactat caatctgcgg ctctgggtcaa caaaagctcc ttccgaagat 1440  
tttgatttat cttcatataa ctctgggaag catactgagg cagcagaagc tctattcaac 1500  
gctgaaaagg tttgtatctt cattaagttt catttaaaagt tgctttcaca attttgtttt 1560  
ttcgaccatg atctatttac aagatccttc tagtaattgg aatagtgcac atatctttaa 1620  
aattgagtga gaaccagcag aaatgaatat gttatcacag agagattagt cttgcgtcac 1680

ttgtgcttgt ttatataacg agcttttgat gtgtatatac tgaaaagtgg ttgttttctt	1740
cccttccctc ctgatggaat tagatttgct tcgtgcttta ccccgagat gagtcaactg	1800
aaggaaaggc tcttcgtctg aagcaacaat acactctgtg ctcagcctcg ctacaagata	1860
tcgtagcacg ttttgagaca aggtctggag gaaacgtcaa ctgggaagaa tttccagaga	1920
aggttgcagt gcagatgaat gacactcacc ctaccctatg cattcctgag ctaatgagga	1980
ttctaattgga tttaaaagga ctaagctggg aagacgcttg gaaaatcaca caaagggtact	2040
ggcaggatat atgccaacgt aaaaatgagg gcaatcgatt gtactgaatc ggattttcaa	2100
gggtctggcc aaaactattc cgtgggcacc tggcacacgc cctggagtcc ggcccgtttc	2160
cagttgaggg ttgtctacgc ttagatgaga aggaaagttg tccaagacga atcccagtg	2220
cctattacca atagccgacg gtatcgataa gcttgatgta catggtcgat aagaaaaggc	2280
aatttgtaga tgtaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa	2340
taacaagtca ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt	2400
cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag	2460
tgcgatatta tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggac	2520
catcgatcc tagacgcgtg agatcagatc tcggtgacgg gcaggaccgg acggggcggt	2580
accggcaggc tgaagtcag ctgccagaaa cccacgtcat gccagttccc gtgcttgaag	2640
ccggccgccc gcagcatgcc gcggggggca tatccgagcg cctcgtgcat gcgcacgctc	2700
gggtcgttgg gcagcccgat gacagcgacc acgctcttga agccctgtgc ctccaggac	2760
ttcagcaggt ggggtgtagag cgtggagccc agtcccgtcc gctgggtggcg gggggagacg	2820
tacacggctg actcgccgt ccagtcgtag gcgttgctg ccttcagggg gcccgctag	2880
gcgatgccgg cgacctgcc gtccacctcg gcgacgagcc agggatagcg ctcccgcaga	2940
cggacgaggt cgtccgtcca ctctgcgggt tcctgcggct cggtagcgaa gttgaccgtg	3000
cttgtctcga tgtagtgggt gacgatgggt cagaccgccg gcatgtccgc ctcggtggca	3060
cggcggatgt cggccggcg tcgttctggg ctcatggatc cgatttgtag agagagactg	3120
gtgatttcag cgtgtcctct ccaaataaaa tgaacttct tatatagagg aagggtcttg	3180
cgaaggatag tgggattgtg cgtcatccct tacgtcagtg gagatatcac atcaatccac	3240
ttgctttgaa gacgtgggtg gaacgtcttc tttttccacg atgctcctcg tgggtggggg	3300
tccatctttg ggaccactgt cggcagaggc atcttgaacg atagcctttc ctttatcgca	3360
atgatggcat ttgtaggtgc caccttccct ttctactgtc cttttgatga agtgacagat	3420
agctgggcaa tggaatccga ggagggtttcc cgatattacc ctttggtgaa aagtctcaat	3480

agcccttttg ttttctgaga ctgtatcttt gatattcttg gagtagacga gagtgtcgtg 3540  
ctccaccatg ttgacgaaga ttttcttctt gtcattgagt cgtaaaagac tctgtatgaa 3600  
ctgttcgcca gtcttcacgg cgagttctgt tagatcctcg atctgaattt ttgactccat 3660  
ggcctttgat tcagtaggaa ctactttctt agagactcca atctctatta cttgccttg 3720  
tttatgaagc aagccttgaa tcgtccatac tggaatagta cttctgatct tgagaaatat 3780  
atctttctct gtgttcttga tgcagttagt cctgaatctt ttgactgcat ctttaacctt 3840  
cttggaaggg tatttgatct cctggagatt attactcggg tagatcgtct tgatgagacc 3900  
tgccgcgtag gcctctctaa ccatctgttg gtcagcattc tttctgaaat tgaagaggct 3960  
aatcttctca ttatcgggtg tgaacatggg atcgtcacct tctccgtcga actttcttcc 4020  
tagatcgtag agatagagaa agtcgtccat ggtgatctcc ggggcaaagg agatccgtca 4080  
attccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag 4140  
cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccagggcttt acactttatg 4200  
cttccggctc gtataatgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagg 4260  
atcatgagcg gagaattaag ggagtcacgt tatgaccccc gccgatgacg cgggacaagc 4320  
cgttttacgt ttggaactga cagaacgcga acgattgaag gagccactca gccgcgggtt 4380  
tctggagttt aatgagctaa gcacatacgt cagaaacat tattgcgcgt tcaaaagtcg 4440  
cctaaggta ctatcagcta gcaaataattt cttgtcaaaa atgctccact gacgttccat 4500  
aaattcccct cggtatccaa ttagagtctc atattcactc tcaatcaaag atccggccca 4560  
tgatcatgtg gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga 4620  
ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc 4680  
ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga 4740  
atgaactgca ggacgaggca gcgoggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg 4800  
cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc 4860  
cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg 4920  
atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg ccatttcgac caccaagcga 4980  
aacatcgc atcgagcgagca cgtactcgga tggaagcggg tcttgctgat caggatgatc 5040  
tggaacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca 5100  
tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg 5160  
tggaatatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct 5220  
atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgtgaaga gcttggcggc gaatgggctg 5280  
accgcttct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc 5340



gcctttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctgggggttc gaaatgaccg accaagcgac 5400  
gcccacctg ccatcacgag atttcgattc caccgcgcgc ttctatgaaa ggttgggctt 5460  
cggaatcggt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga 5520  
gttcttcgcc caccctctgc tttaatgaga tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt 5580  
tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta 5640  
ccgcgggttt cggttcattc taatgaatat atcaccggtt actatcgat ttttatgaat 5700  
aatattctcc gttcaattta ctgattgtac cctactactt atatgtacaa tattaaaatg 5760  
aaaacaatat attgtgctga atagggtttat agcgacatct atgatagagc gccacaataa 5820  
caaacaattg cgttttatta ttacaaatcc aattttaaaa aaagcggcag aaccggtcaa 5880  
acctaaaaga ctgattacat aaatcttatt caaatttcaa aaggccccag gggctagtat 5940  
ctacgacaca ccgagcggcg aactaataac gttcactgaa gggaactccg gttccccgcc 6000  
ggcgcgcatg ggtgagattc cttgaagttg agtattggcc gtccgctcta ccgaaagtta 6060  
cgggcaccat tcaaccgggt ccagcacggc ggccgggtaa ccgacttgct gccccgagaa 6120  
ttatgcagca tttttttggt gtatgtgggc cccaaatgaa gtgcaggtca aaccttgaca 6180  
gtgacgacaa atcgttgggc ggggtccaggc cgaattttgc gacaacatgt cgaggctcag 6240  
caggggctcg atccccctga tcgaattcga tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcgat 6300  
aatttatcct agtttgcgcg ctatattttg ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc 6360  
gggactctaa tcataaaaaac ccatctcata aataacgtca tgcattacat gtttaattatt 6420  
acatgcttaa cgtaattcaa cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga 6480  
ttcaatctta agaaacttta ttgccaaatg tttgaacgat cgagctcaat tccccaccga 6540  
ggctgtagcc gacgatggtg cgccaggaga gttgttgatt cattgtttgc ctccctgctg 6600  
cggtttttca ccgaagttca tgccagtcca gcgtttttgc agcagaaaag ccgccgactt 6660  
cggtttgcgg tcgcgagtga agatcccttt cttgttaccg ccaacgcgca atatgccttg 6720  
cgaggctgca aaatcggcga aattccatac ctgttcaccg acgacggcgc tgacgcgatc 6780  
aaagacgcgg tgatacatat ccagccatgc aactgatac tcttcactcc acatgtcggt 6840  
gtacattgag tgcagcccgg ctaacgtatc cacgccgat tcggtgatga taatcggctg 6900  
atgcagtttc tcttgccagg ccagaagttc tttttccagt accttctctg ccgtttccaa 6960  
atcgccgctt tggacatacc atccgtaata acggttcagg cacagcacat caaagagatc 7020  
gctgatggta tcggtgtgag cgtcgcagaa cattacattg acgcaggtga tcggacgcgt 7080  
cgggtcgagt ttacgcgttg cttccgccag tggcgaaata ttcccgtaga cttgcggacg 7140

ggatatccggt tcgttggcaa tactccacat caccacgctt ggggtggtttt tgtcacgcgc 7200  
tatcagctct ttaatcgctt gtaagtgcgc ttgctgagtt tccccgttga ctgcctcttc 7260  
gctgtacagt tctttcggct tgttgcccgc ttcgaaacca atgcctaaag agagggttaa 7320  
gccgacagca gcagtttcat caatcaccac gatgccatgt tcatctgccc agtcgagcat 7380  
ctcttcagcg taagggtaat gcgaggtagc gtaggagttg gcccacatcc agtccattaa 7440  
tgctggtcg tgcaccatca gcacgttatc gaatcctttg ccacgtaagt ccgcatcttc 7500  
atgacgacca aagccagtaa agtagaacgg tttgtggtta atcaggaact gttggccctt 7560  
cactgccact gaccggatgc cgacgcgaag cgggtagata tcacactctg tctggctttt 7620  
ggctgtgacg cacagttcat agagataacc ttcacccggt tgccagaggt gcgattcac 7680  
cacttgcaaa gtcccgtag tgccttgtec agttgcaacc acctgttgat ccgcatcacg 7740  
cagttcaacg ctgacatcac cattggccac cacctgccag tcaacagacg cgtggttaca 7800  
gtcttgccg acatgcgtca ccacggtgat atcgccacc caggtgttcg gcgtggtgta 7860  
gagcattacg ctgcgatgga ttccggcata gttaaagaaa tcatggaagt aagactgctt 7920  
tttcttgccg ttttcgtcgg taatcaccat tcccgccggg atagtctgcc agttcagttc 7980  
gttggtcaca caaacggtga tacgtacact tttcccgcca ataacatacg gcgtgacatc 8040  
ggcttcaa at ggctatagc cgccctgatg ctccatcact tctgattat tgaccacac 8100  
tttgccgtaa tgagtgaccg catcgaaacg cagcacgata cgctggcctg cccaaccttt 8160  
cggataaaag acttcgcgct gataccagac gttaaaaatg actgaactaa ttgtcgggca 8220  
tgctacatat gtgtctattt gttcctatat ttagtctctg gtgcttgtec caaataaaag 8280  
atagtttaca agaataaaac ctgcaacgtg tttctcaaaa gttataaatt tttttaggac 8340  
tgtggcatac acaaaccata cagtcttgcc tgaggcactg gagaagtgga gtttagaact 8400  
catggagaaa ttgcttcctc gtcattgtga gattatcgaa aagattgatg aggaggtcat 8460  
ccctgaacaa catatcaaat gtctcttcta tttttttcat atcgggtcta atttgtactt 8520  
tcatgtattg cagctagttc gcacaattgt ttcagagtat ggcaccgcgg atcctgactt 8580  
acttgaagaa aaactgaagg caatgaggat cttggaaaat gtcgagttgc cttctgcctt 8640  
tgcagatgtg atcgtgaagc cggatgaacaa accagttact gcaaaagatg ctcaaaatgg 8700  
cgtgaaaacg gaacaagaag aggaaaaaac tgctggagag gaagaggaag acgaagttat 8760  
cccagaacca acagtagaac cccccaagat ggtccgtatg gccaaccttg ctgttggtggg 8820  
tggtcatgct gtaaattggcg ttgcagagat acacagtga atagtgaagc aggacgtgtt 8880  
taatgattto gtacaggtaa acattctaac tagtgaagca tgatgctata aaatgctcta 8940  
caggaagaa cacaactctc atcgttcaat attctatatt ttttgagtt gtggccagaa 9000

aaatttcaga	acaaaacaaa	tggagtaaca	ccaaggcgat	ggattcgttt	ttgcaaccca	9060
tatttaagtg	atattataac	taactggata	ggcacagaag	actgggtcct	aaataaccgaa	9120
aagggtgcgg	aactaagaaa	ggtatgtact	ttatcagatt	caatgttggt	tcacatgctg	9180
ttatctttat	tgggcgacat	tggttatcat	tgtttggtct	ttctccagtt	tgcagataat	9240
gaagatctcc	aatctgagt	gagggcagca	aagaagaaga	acaagttgaa	ggttgatatca	9300
cttatcaagg	aaagaactgg	atatactgtc	agccccgatg	caatgttoga	cattcaggtc	9360
agttccaatg	gatcttggtt	acttttagat	tgatgagttg	tttgcttggg	tttttcggtt	9420
tgagaagtcc	tttacgcaac	tctgagtagc	ttatgtagat	tcttttcttt	ttgcattgaa	9480
aactttttgc	agatcaagcg	tatacatgag	tacaagcgac	aactgctaaa	tatcttggga	9540
attgtttacc	gctacaaaaa	gatgaaggaa	atgagtgcta	gtgagagaga	gaaagcattt	9600
gttccaagag	tttgcataat	tgggggaaaa	gcatttgcca	catatgtgca	agctaagaga	9660
attgttaaat	ttatcacaga	tgttgcgctc	acaattaacc	atgatccaga	aataggtgac	9720
ctccttaagg	tatatatcta	cttacgttct	tgtattagtc	gtattctcaa	gcgtataacg	9780
gaaaatctgc	aataattatc	tggtttttgc	atctgtggag	attggcactt	actaattaga	9840
agtgttaact	aaacatgtag	gttatctttg	ttcctgatta	caatgtcagt	gttgctgaat	9900
tgctcattcc	agcaagtgag	ctttctcagc	acatcaggta	aaaacttctt	tggcttagtc	9960
acattatagt	ttttggtcac	aactccatga	agttaaaata	ttgaaattga	gataaccggt	10020
aaaccatgaa	ctggactagt	ttctcttttt	ttcataagaa	ctttagaaac	aaatcctgac	10080
acaaggaaca	atatgtttcg	gttacattta	tgaaaggtta	taatcaatgg	cactcatact	10140
ttttgctgga	gactaagagt	ttctctctgc	agtactgctg	ggatggaagc	tagtgggaca	10200
agcaacatga	aattttcgat	gaacggttgc	gttttgattg	gaaccttggg	tggggcgaat	10260
gtcgagatta	gagaagaagt	tggagaagaa	aatttcttcc	tctttggtgc	caaagctgat	10320
cagattgtga	acctcaggaa	ggagagagca	gagggaaaag	tatatactat	ttgaagagtt	10380
aaccttacca	tgcttctgtt	ttagcatcaa	caagaatttg	atttttgacc	tggctcttgg	10440
cattccagtt	tgttcccgat	cctacttttg	aagaagtcaa	gaagtctggt	ggaagcggcg	10500
tctttggctc	aaatagctat	gatgaactaa	tgggtctctt	ggaaggaaac	gaaggctttg	10560
gacgagcgga	ttacttccta	gttggcaaag	actttcctag	ttacatcgaa	tgccaagaaa	10620
aagtcgacga	ggcataccga	gaccagaaag	taagtactaa	tgcattttct	ttgaacatca	10680
agctaataat	gttgactaaa	atatgaaact	tactcaaata	tcaaaccttg	aaattgctgt	10740
taaatgatta	cagagatgga	cgagaatgtc	aataatgaac	acagcaggtt	cattcaagtt	10800

tagcagtgac cggacgatcc acgaatacgc caaagacata tggaatatta agcaagtgga 10860

acttccatga 10870

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000753

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 A01H5/10  
A01H5/00 C12N5/10 C12N5/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMITH ALISON M ET AL: "Starch mobilization in leaves." January 2003 (2003-01), JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, VOL. 54, NR. 382, PAGE(S) 577-583, XP002289668 ISSN: 0022-0957 Page 580, paragraphe intitulé "Starch phosphorylase"	1-9
X	WO 98/40503 A (KOSSMANN JENS ; FROHBERG CLAUS (DE); PLANTTEC BIOTECHNOLOGIE GMBH (DE)) 17 September 1998 (1998-09-17) cited in the application page 14, line 30 - page 17, line 24; figure 1; example 3 ----- -/--	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 2005

Date of mailing of the international search report

05/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000753

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SONNEWALD U ET AL: "A SECOND L-TYPE ISOZYME OF POTATO GLUCAN PHOSPHORYLASE: CLONING, ANTISENSE INHIBITION AND EXPRESSION ANALYSIS" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 27, 1995, pages 567-576, XP002044528 ISSN: 0167-4412 cited in the application abstract	5-7
X	WO 98/35051 A (LYNCH DERMOT ROBOG ; ARMSTRONG JOHN DAVID (CA); CANADA AGRICULTURE (C) 13 August 1998 (1998-08-13) abstract; claim 1; example 1	5-7
X	DUWENIG E ET AL: "Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plant ( Solanum tuberosum L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 12, no. 2, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 323-333, XP002093023 ISSN: 0960-7412 abstract	5-7
X	WO 97/44471 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; KOSSMANN JENS (DE); DUWENIG ELKE (DE); STEUP) 27 November 1997 (1997-11-27) abstract; examples 1-3	5-7
X	DUWENIG E ET AL: "THE ROLE OF STARCH PHOSPHORYLASE IN POTATO: THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF AN ENIGMATIC ENZYME" PLANT PHYSIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 111, no. 2, 1 June 1996 (1996-06-01), page 48, XP002070972 ISSN: 0032-0889 the whole document	5-7
A	WO 01/00833 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ; PELLETIER GEORGES (FR); HOFFMANN BEATE (FR) 4 January 2001 (2001-01-04) abstract; figure 9	8,9
A	US 2003/135883 A1 (SINGLETARY GEORGE W ET AL) 17 July 2003 (2003-07-17) page 2 '0019! et '0021!, et page 3 '0052! et '0053!	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000753

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9840503	A	17-09-1998	DE 19709775 A1	17-09-1998
			AU 730569 B2	08-03-2001
			AU 6727298 A	29-09-1998
			CA 2283632 A1	17-09-1998
			WO 9840503 A1	17-09-1998
			EP 0972059 A1	19-01-2000
			JP 2001514514 T	11-09-2001
			US 2002133849 A1	19-09-2002
			US 6353154 B1	05-03-2002
WO 9835051	A	13-08-1998	US 5998701 A	07-12-1999
			AU 724942 B2	05-10-2000
			AU 5849398 A	26-08-1998
			BR 9807214 A	25-04-2000
			CA 2275885 A1	13-08-1998
			WO 9835051 A1	13-08-1998
			CN 1246894 A	08-03-2000
			CN 1113143 C	02-07-2003
			EP 1009839 A1	21-06-2000
			HU 0000542 A2	28-06-2000
			JP 2001511007 T	07-08-2001
			NZ 336766 A	25-08-2000
			PL 334962 A1	27-03-2000
WO 9744471	A	27-11-1997	DE 19619917 A1	20-11-1997
			AU 2899297 A	09-12-1997
			WO 9744471 A2	27-11-1997
			EP 0906438 A2	07-04-1999
WO 0100833	A	04-01-2001	FR 2795424 A1	29-12-2000
			AT 286129 T	15-01-2005
			AU 780425 B2	17-03-2005
			AU 5991000 A	31-01-2001
			CA 2377521 A1	04-01-2001
			DE 60017139 D1	03-02-2005
			EP 1196581 A1	17-04-2002
			WO 0100833 A1	04-01-2001
			US 2003106105 A1	05-06-2003
US 2003135883	A1	17-07-2003	US 6423886 B1	23-07-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR2005/000753

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 A01H5/10  
A01H5/00 C12N5/10 C12N5/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SMITH ALISON M ET AL: "Starch mobilization in leaves." janvier 2003 (2003-01), JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, VOL. 54, NR. 382, PAGE(S) 577-583 , XP002289668 ISSN: 0022-0957 Page 580, paragraphe intitulé "Starch phosphorylase"	1-9
X	WO 98/40503 A (KOSSMANN JENS ; FROHBERG CLAUD (DE); PLANTTEC BIOTECHNOLOGIE GMBH (DE)) 17 septembre 1998 (1998-09-17) cité dans la demande page 14, ligne 30 - page 17, ligne 24; figure 1; exemple 3  --/--	1-9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
29 juillet 2005	05/08/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  Loubradou, G



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/000753

### Cadre N° 1 Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.b de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
  - a. Nature de l'élément
    - ☒ un listage de la ou des séquences
    - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
  - b. Type de support
    - ☒ sur papier sous forme écrite
    - ☒ sur support électronique sous forme déchiffrable par ordinateur
  - c. Moment du dépôt ou de la remise
    - ☒ contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée
    - ☒ déposé(s) avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur
    - ☐ remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SONNEWALD U ET AL: "A SECOND L-TYPE ISOZYME OF POTATO GLUCAN PHOSPHORYLASE: CLONING, ANTISENSE INHIBITION AND EXPRESSION ANALYSIS"</p> <p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 27, 1995, pages 567-576, XP002044528</p> <p>ISSN: 0167-4412</p> <p>cité dans la demande abrégé</p>	5-7
X	<p>WO 98/35051 A (LYNCH DERMOT ROBORG ; ARMSTRONG JOHN DAVID (CA); CANADA AGRICULTURE (C) 13 août 1998 (1998-08-13)</p> <p>abrégé; revendication 1; exemple 1</p>	5-7
X	<p>DUWENIG E ET AL: "Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plant (Solanum tuberosum L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism"</p> <p>PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 12, no. 2, 1 août 1997 (1997-08-01), pages 323-333, XP002093023</p> <p>ISSN: 0960-7412</p> <p>abrégé</p>	5-7
X	<p>WO 97/44471 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; KOSSMANN JENS (DE); DUWENIG ELKE (DE); STEUP) 27 novembre 1997 (1997-11-27)</p> <p>abrégé; exemples 1-3</p>	5-7
X	<p>DUWENIG E ET AL: "THE ROLE OF STARCH PHOSPHORYLASE IN POTATO: THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF AN ENIGMATIC ENZYME"</p> <p>PLANT PHYSIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 111, no. 2, 1 juin 1996 (1996-06-01), page 48, XP002070972</p> <p>ISSN: 0032-0889</p> <p>le document en entier</p>	5-7
A	<p>WO 01/00833 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ; PELLETIER GEORGES (FR); HOFFMANN BEATE (FR) 4 janvier 2001 (2001-01-04)</p> <p>abrégé; figure 9</p>	8,9
A	<p>US 2003/135883 A1 (SINGLETARY GEORGE W ET AL) 17 juillet 2003 (2003-07-17)</p> <p>page 2 '0019! et '0021!, et page 3 '0052! et '0053!</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

mbres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/000753

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9840503	A	17-09-1998	DE 19709775 A1	17-09-1998
			AU 730569 B2	08-03-2001
			AU 6727298 A	29-09-1998
			CA 2283632 A1	17-09-1998
			WO 9840503 A1	17-09-1998
			EP 0972059 A1	19-01-2000
			JP 2001514514 T	11-09-2001
			US 2002133849 A1	19-09-2002
			US 6353154 B1	05-03-2002
WO 9835051	A	13-08-1998	US 5998701 A	07-12-1999
			AU 724942 B2	05-10-2000
			AU 5849398 A	26-08-1998
			BR 9807214 A	25-04-2000
			CA 2275885 A1	13-08-1998
			WO 9835051 A1	13-08-1998
			CN 1246894 A	08-03-2000
			CN 1113143 C	02-07-2003
			EP 1009839 A1	21-06-2000
			HU 0000542 A2	28-06-2000
			JP 2001511007 T	07-08-2001
			NZ 336766 A	25-08-2000
			PL 334962 A1	27-03-2000
WO 9744471	A	27-11-1997	DE 19619917 A1	20-11-1997
			AU 2899297 A	09-12-1997
			WO 9744471 A2	27-11-1997
			EP 0906438 A2	07-04-1999
WO 0100833	A	04-01-2001	FR 2795424 A1	29-12-2000
			AT 286129 T	15-01-2005
			AU 780425 B2	17-03-2005
			AU 5991000 A	31-01-2001
			CA 2377521 A1	04-01-2001
			DE 60017139 D1	03-02-2005
			EP 1196581 A1	17-04-2002
			WO 0100833 A1	04-01-2001
			US 2003106105 A1	05-06-2003
US 2003135883	A1	17-07-2003	US 6423886 B1	23-07-2002